



การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากน้ำมันไบโอดีเซลและการควบคุมกำจัด

สาวิตรี วัฒนญ์ไพศาล^{1*} และ ถวิลวงศ์ คุณาก้องเกียรติ²

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ทำการแยกจุลินทรีย์จากน้ำมันไบโอดีเซล 11 ตัวอย่างจากสถานีบริการน้ำมันต่างๆ ในกรุงเทพมหานคร และปริมณฑล โดยแยกแบคทีเรียได้ 30 ไอโซเลต และเชื้อราได้ 39 ไอโซเลต ผลการนำจุลินทรีย์ที่แยกได้มาทดสอบการเจริญในน้ำมันไบโอดีเซล (B5) เป็นเวลา 28 วัน พบว่าแบคทีเรียไม่เจริญหรือเจริญได้น้อยมากในขณะที่ราเกิดการเจริญของเส้นใยระหว่างชั้นน้ำมันและชั้นอาหารเลี้ยงเชื้อแผ่ไปทั่วขวดเพาะเลี้ยง ไอโซเลตที่เจริญได้ดีและมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงที่สุดคือ ไอโซเลต P3-m3 (447.7 มิลลิกรัม) รองลงมาคือ P3-m2 และ B3-m3 ได้น้ำหนักแห้ง 411.6 มิลลิกรัม และ 340.5 มิลลิกรัม ตามลำดับ และผลการจำแนก 3 ไอโซเลตดังกล่าวด้วยวิธีอนุกรมวิธานพบว่า 2 ไอโซเลตแรกเป็น *Aspergillus* spp. และไอโซเลต B3-m3 เป็น *Talaromyces spectabilis* การทดสอบความสามารถของสารเพิ่มประสิทธิภาพเครื่องย่นต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์พบว่า STP Fuel System Cleaner ยับยั้งแบคทีเรียมากที่สุด 10 ไอโซเลต โดยมีค่า MIC (Minimum Inhibitory Concentrations) เท่ากับ 0.50 และ 1 และ

เฉพาะสารนี้เท่านั้นที่พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อราได้ 2 ไอโซเลตในระดับที่ไม่เจือจางสาร ส่วนสารเติมแต่งเครื่องย่นตัวอื่นที่ทดสอบไม่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ในขณะที่การทดสอบการใช้สารฆ่าเชื้อต่อประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อราที่สามารถเจริญในน้ำมันได้สูงสุด 6 ไอโซเลตพบว่าสาร Grotamar 71 และสาร Isothiazolone สามารถกำจัดเชื้อราได้ทุกไอโซเลตแต่มีค่า MIC แตกต่างกันไป โดย Grotamar มีค่า MIC อยู่ระหว่าง 0.0625 ถึง 0.125 ในขณะที่สาร Isothiazolone มีค่า MIC 0.0005 ถึง 0.001 การทดสอบประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อในการกำจัดไบโอฟิล์มบนไส้กรองเชื้อเพลิงทำโดยการคัดเลือก *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ P3-m3 ที่มีการเจริญในน้ำมันได้สูงสุด มาเลี้ยงให้เกิดไบโอฟิล์มเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำไส้กรองดังกล่าวมาแช่ในสารฆ่าเชื้อ Grotamar 71 ที่ระดับความเจือจาง 0.125 หรือสาร Isothiazolone ที่ความเจือจาง 0.001 เป็นเวลา 30 นาที สามารถยับยั้งการเจริญของไบโอฟิล์มได้

คำสำคัญ: ไบโอดีเซล จุลินทรีย์ แบคทีเรีย เชื้อรา การปนเปื้อน สารเพิ่มประสิทธิภาพ สารฆ่าเชื้อ

¹ รองศาสตราจารย์ ภาควิชาเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร อาหารและสิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ

² นักศึกษา ภาควิชาเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร อาหารและสิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ

* ผู้นิพนธ์ประสานงาน โทรศัพท์ 0-2555-2000 ต่อ 4722 อีเมล: svt@kmutnb.ac.th

Growth of Microorganisms Isolated from Biodiesel Fuel and Their Control

Savitri Vatanyoopaisarn^{1*} and Tavinpong Kuhakongkeat²

Abstract

Isolation of microorganisms from biodiesel fuel sold in 11 petrol stations in Bangkok and suburb was carried out. Thirty bacterial isolates and 39 fungal isolates were found. The growth of all microbial isolates in biodiesel (B5) oil were examined for up to 28 days at ambient temperature. The results showed that bacterial isolates had very low or no growth. Whereas all fungal isolates developed the hyphal growth between oil and liquid interface. The highest dry weight was found in P3-m3 (447.7 mg), followed by P3-m2 (411.6 mg) and B3-m3 (340.5 mg), respectively. The identification of such mold isolates by analyzing the nucleotide sequence of 18S rRNA revealed that the first two isolates are *Aspergillus* spp., whilst the B3-m3 is *Talaromyces spectabilis*. The examination of commercially available fuel additives on its biocide effect was performed. It was found that the STP fuel system cleaner showed the inhibitory activity against 10 bacterial isolates with the MIC (Minimum inhibitory concentrations) of 0.50 to 1. Furthermore such additive was the only one that

showed inhibitory activity against only 2 isolates of mold at undiluted concentration, whereas the other fuel additives exhibited no biocide activity. In contrast, determination of MIC of two disinfectants against 6 mold isolates which gave highest growth in biodiesel was also carried out. It was observed that Grotamar 71 had the MIC of 0.0625 - 0.125, whilst isothiazolone had the MIC in between 0.0005 - 0.001. Finally *Aspergillus* sp strain P3-m3 was selected to study the efficiency of these 2 biocides on the potential to control the growth of biofilm. The fuel filter paper was used as a matrix for the formation of fungal biofilm. Thereafter the fuel filter papers with 3 day-old fungal biofilm were soaked in either Grotamar 71 or isothiazolone at the MIC of 0.125 and 0.001, respectively for 30 min. The image analysis of biofilm percentage coverage exhibited significant decrease of the fungal biofilm tested.

Keywords: Biodiesel, Microorganism, Bacteria, Fungi, Contamination, Fuel Additive, Disinfectant, Biocide

¹ Associate Professor, Department of Agro-Industrial, Food and Environmental Technology, Faculty of Applied Science, King Mongkut's University of Technology North Bangkok.

² Postgraduate Student, Department of Agro-Industrial, Food and Environmental Technology, Faculty of Applied Science, King Mongkut's University of Technology North Bangkok.

* Corresponding Author, Tel. 0-2555-2000 Ext. 4722, E-mail: svt@kmutnb.ac.th

1. บทนำ

น้ำมันดีเซลเป็นหนึ่งในพลังงานที่สำคัญต่อเศรษฐกิจโลก เนื่องจากถูกใช้เป็นเชื้อเพลิงในการคมนาคมขนส่งและอุตสาหกรรม การทดลองนำน้ำมันพืชมาใช้เป็นพลังงานสำหรับเครื่องยนต์เกิดขึ้นมานานหลายทศวรรษแล้ว แต่มีการนำมาใช้เชิงพาณิชย์อย่างจริงจังไม่นานมานี้ เนื่องจากราคาน้ำมันดิบในตลาดโลกที่เพิ่มสูงขึ้น ประเทศที่ไม่ได้เป็นแหล่งผลิตน้ำมันปิโตรเลียม จึงเร่งหาพลังงานทางเลือก รวมทั้งประเทศไทยที่มีความตื่นตัวและรณรงค์ให้มีการใช้น้ำมันไบโอดีเซลโดยรัฐบาลได้มียุทธศาสตร์การพัฒนาและส่งเสริมการใช้ไบโอดีเซลจากปาล์มตั้งแต่ปี พ.ศ. 2548 จากข้อมูลของกระทรวงพลังงาน พบว่าปริมาณการจำหน่ายน้ำมันดีเซลหมุนเร็ว บี5 ภายในประเทศ ปี พ.ศ. 2551 เป็น 10.3 ล้านลิตรต่อวัน และเพิ่มขึ้นเท่าตัวในปี พ.ศ. 2552 เป็น 22.3 ล้านลิตรต่อวัน และ พ.ศ. 2553 ใช้ 19.4 ล้านลิตรต่อวัน [1] กลางปี พ.ศ. 2554 รัฐบาลได้กำหนดให้น้ำมันดีเซลหมุนเร็วมีสัดส่วนไบโอดีเซลร้อยละ 3-5 (ดีเซลกรีน) ตามฤดูกาลของผลผลิตปาล์มน้ำมัน [2] ในปี พ.ศ. 2555 ได้ส่งเสริมการใช้วัตถุดิบทั้งน้ำมันปาล์มและน้ำมันพืชใช้แล้วและน้ำมันสบู่ดำ [3]

ไบโอดีเซลคือสารประกอบออลคิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (เมทิลเอสเทอร์ โพรพิลเอสเทอร์ หรือเอทิลเอสเทอร์) ผลิตได้จากน้ำมันพืชหรือไขมันสัตว์ สามารถนำไปใช้กับเครื่องยนต์ดีเซลได้โดยไม่มีการดัดแปลงหรือดัดแปลงเครื่องยนต์น้อยมาก โดยหากเป็นไบโอดีเซลที่ไม่มีการผสมกับน้ำมันจากปิโตรเลียมอื่นเรียก บี100 (B100) หากมีการผสมกับน้ำมันดีเซลจะเรียกตามสัดส่วนดังนี้ บี20 (B20) คือน้ำมันไบโอดีเซล 20 ส่วน ผสมน้ำมันดีเซล 80 ส่วน บี5 (B5) มีไบโอดีเซล 5 ส่วน ดีเซล 95 ส่วน เป็นต้น [4], [5]

ผลงานวิจัยการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในน้ำมันดีเซลมีรายงานอยู่ไม่มาก Bento และ Gaylarde [6] ได้ทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์จากถังเก็บน้ำมันในโรงกลั่น สถานีบริการที่จำหน่ายน้ำมัน และปั๊มหัวฉีดของรถเมล์ที่ใช้ น้ำมันดีเซลในประเทศบราซิล พบว่าเชื้อราเจริญได้ดีมาก

ซึ่งได้แก่ สกุล *Hormoconis*, *Aspergillus*, *Paecilomyces* นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียในกลุ่ม Sulfate Reducing Bacteria และ *Micrococcus* ผลการทดสอบผสมสารฆ่าเชื้อ Isothiazolone 0.1 ppm ลงในน้ำมันดีเซลกลับพบว่ามีความลดลงของเชื้อจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นในขณะที่การใช้ 10 ppm จึงจะลดเชื้อลงได้มากกว่า 2 log ภายใน 24 ชม. และ 9 log ภายใน 120 ชม.

Klofutar และ Golob [7] ได้ทดลองเติมสารฆ่าเชื้อ (PBK 2.5 BD ของบริษัท Pinus d.d. Slovenia) ลงในน้ำมันดีเซล และไบโอดีเซล บี5 และ บี100 ที่เติมเชื้อจุลินทรีย์ทั้งเชื้อราและแบคทีเรียลงไปเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าน้ำมันดีเซลและไบโอดีเซลที่ไม่เติมสารฆ่าเชื้อมีปริมาณจุลินทรีย์สูงจนถึงสัปดาห์ที่ 4 ของการทดลอง ส่วนที่เติมสารฆ่าเชื้อพบว่าในน้ำมันดีเซลยังพบจุลินทรีย์ถึง 1,000 โคโลนีต่อ 1,000 มิลลิลิตร ส่วนน้ำมัน บี5 ที่เติมสารฆ่าเชื้อพบจุลินทรีย์ 150 โคโลนีต่อ 1,000 มิลลิลิตร ในขณะที่สารฆ่าเชื้อมีประสิทธิภาพดีเมื่อใช้กับน้ำมัน บี100 เนื่องจากไม่พบเชื้อเจริญเลย

ในเชื้อเพลิงที่มีสารประกอบไฮโดรคาร์บอนพบว่ามีจุลินทรีย์บางชนิดสามารถย่อยสลายหรือใช้น้ำมันเป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนได้ บริเวณที่พบการสะสมของจุลินทรีย์คือบริเวณตะกอนที่ก้นถังเก็บน้ำมัน ตัวอย่างเช่น น้ำมันดีเซล ตามมาตรฐานของยุโรปยอมให้มีปริมาณน้ำได้ 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัม [7] ส่วนในไบโอดีเซลยอมให้มีปริมาณน้ำได้มากกว่าถึง 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม [8] การเจริญของจุลินทรีย์จึงเกิดจากน้ำที่สะสมอยู่ดังกล่าว ปริมาณน้ำเพียง 1% (v/v) ก็เพียงพอต่อการเจริญของจุลินทรีย์ยิ่งบริเวณชั้นตะกอนก้นถังเป็นบริเวณที่เกิดชั้นระหว่างน้ำกับน้ำมันทำให้จุลินทรีย์เจริญ [7] จุลินทรีย์ที่พบว่าเจริญในน้ำมันเชื้อเพลิง ได้แก่ เชื้อราและแบคทีเรียที่สร้างสารโพลีเมอร์ได้ ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาสำคัญคือทำให้ท่อส่งน้ำมันอุดตัน อุดตันวาล์ว และไส้กรองต่างๆ และอาจส่งผลไปถึงเครื่องยนต์ที่ใช้น้ำมันนั้น เช่น อุดตันหัวฉีดเครื่องยนต์เนื่องจากจุลินทรีย์สามารถเกาะติดอยู่ตามพื้นผิวของวัสดุต่างๆ ได้เช่น ผงของถังเก็บและ

ทอส่งน้ำมัน [9] จุลินทรีย์ที่เกาะติดและเจริญอยู่บนพื้นผิววัสดุเหล่านี้เรียกว่าไบโอฟิล์ม [10]

อย่างไรก็ตามการตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนจากน้ำมันไบโอดีเซล จนถึงปัจจุบันนี้ยังไม่พบรายงานวิจัยที่ตีพิมพ์ มีเพียงการรวบรวมหลักฐานว่ามีโอกาสพบในส่วนตะกอนของถังเก็บน้ำมันได้เนื่องจากปริมาณความชื้นตามมาตรฐานที่ยอมให้พบในน้ำมันไบโอดีเซลสูงกว่าปริมาณความชื้นที่ยอมให้มีในน้ำมันดีเซลถึง 2.5 เท่า [7] ดังนั้นจึงควรศึกษาให้ทราบถึงชนิดของจุลินทรีย์ที่อาจพบปนเปื้อนและสร้างปัญหาให้แก่เครื่องยนต์ นอกจากนี้ภูมิอากาศในประเทศเขตร้อนยังทำให้กระบวนการเก็บรักษาน้ำมันก่อนจำหน่ายไม่สามารถทำได้ที่อุณหภูมิต่ำ ดังนั้นอุณหภูมิในประเทศอบอุ่นจึงน่าจะเป็นปัจจัยเกื้อหนุนต่อการเจริญของจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ และมีโอกาสที่จะพบชนิดของจุลินทรีย์ที่เป็นปัญหาต่างกับประเทศในเขตหนาว งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อแยกเชื้อที่ปนเปื้อนในน้ำมันไบโอดีเซลที่จำหน่ายในประเทศไทย และศึกษาคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารเพิ่มประสิทธิภาพเครื่องยนต์ที่มีจำหน่ายในท้องตลาดรวมทั้งสารฆ่าเชื้ออื่นที่มีโอกาสนำมาผสมในน้ำมันเพื่อเป็นแนวทางในความเข้าใจถึงวิธีการควบคุมจุลินทรีย์มิให้เกิดปัญหาต่อระบบจ่ายน้ำมันเชื้อเพลิง และเครื่องยนต์ที่ใช้เชื้อเพลิงประเภทนี้ต่อไป

2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีวิจัย

2.1 การแยกจุลินทรีย์จากน้ำมันไบโอดีเซล

นำน้ำมันไบโอดีเซล (B5: ชื้อจากสถานีบริการน้ำมัน 11 แห่งแถบกรุงเทพฯ และนนทบุรี) 100 มิลลิลิตร กรองผ่านชุดกรองแบบที่เรียกโดยใช้กระดาษกรอง Cellulose Nitrate ขนาดรูกรอง 45 ไมโครเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (3 ซ้ำ) นำกระดาษกรองที่ผ่านการกรองน้ำมันวางบนอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ Nutrient Agar (NA) และ Acidified Malt Peptone Agar (MPA) [6] บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1-3 วัน กรณีแยกแบคทีเรีย และ 3-7 วันกรณีแยกเชื้อยีสต์รา เชื้อโคไลนีที่แยกออกมาเป็นโคไลนีเดี่ยวมาเลี้ยงให้

บริสุทธิ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดิม และศึกษาลักษณะทางสัณฐานบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ [11]

2.2 การเตรียมจุลินทรีย์แขวนลอย

นำจุลินทรีย์ที่แยกได้มาเตรียมเซลล์แขวนลอยในสภาพปลอดเชื้อ โดยแบคทีเรียแขวนลอยใน $\frac{1}{4}$ Ringer's Solution (Single Strength Formula: 2.25 g/l NaCl, 0.105 g/l KCl, 0.12 g/l CaCl_2 , 0.05 g/l NaHCO_3) วัดความขุ่นด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ให้ได้ประมาณ 0.5 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ($\text{OD}_{600} = 0.5$) เพื่อให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นอยู่ในช่วง $10^8 - 10^9$ CFU/มิลลิลิตร ส่วนเชื้อรานำมาแขวนลอยด้วย $\frac{1}{2}$ Ringer's Solution จากนั้นนำไปนับจำนวนสปอร์ด้วย Haemocytometer ให้มีจำนวนสปอร์เริ่มต้นประมาณ 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร

2.3 ทดสอบการเจริญในน้ำมันไบโอดีเซล

เตรียม Bushnell-Haas Broth (BHB, Difco) 100 มิลลิลิตร ลงในขวดแก้วเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาด 16 ออนซ์ จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ กรองน้ำมันไบโอดีเซล (B5) ในสภาวะปลอดเชื้อจำนวน 2 ครั้งด้วยเครื่องกรองแบบที่เรียก ครั้งที่ 1 กรองผ่านกระดาษ Cellulose Nitrate ขนาดรูกรอง 0.45 ไมโครเมตร และครั้งที่ 2 กรองผ่านกระดาษกรองขนาดรูกรอง 0.22 ไมโครเมตร นำน้ำมันที่ผ่านการกรองแล้วใส่ลงในขวดแก้วเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีอาหาร BHB ปริมาตร 200 มิลลิลิตร

ปิเปตจุลินทรีย์แขวนลอย 1 มิลลิลิตรใส่ลงในขวดอาหาร BHB ที่มีน้ำมันไบโอดีเซล (อัตราส่วน 1:2) ข้างต้น เขย่าให้เข้ากันบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตรวจสอบการเจริญในน้ำมันทุก 7 วันจนครบ 28 วัน โดยสังเกตความขุ่นในขวดและดูดตัวอย่างมา 0.1 มิลลิลิตร Spread Plate บนอาหาร NA สำหรับแบคทีเรีย และบนอาหาร DRBC (Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol) สำหรับเชื้อรา เมื่อครบ 28 วัน เฉพาะเชื้อราทำการกรองตัวอย่างทั้งหมดผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 วางซ้อน 2 แผ่น และล้างคราบน้ำมันที่ติดอยู่ที่ขวดด้วยเอทานอล

95% จากนั้นนำกระดาษกรองไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 ชั่วโมง คำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้งต่อไป

2.4 ทดสอบสารเพิ่มประสิทธิภาพเครื่องยนต์ และ สารฆ่าเชื้อต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ที่พบในน้ำมันไบโอดีเซลด้วยวิธี Agar Disc Diffusion Method

สารเพิ่มประสิทธิภาพเครื่องยนต์ที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ STP Octane Booster, STP Fuel Injector and Carburetor Treatment, STP Fuel Injector Cleaner, STP Fuel System Cleaner, Motor Plus X-1R Diesel System Treatment และ Top 1 Power Booster. ส่วนสารฆ่าเชื้อได้แก่ Grotamar 71 (ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทเอ็ม เอ เอ็น ยานยนต์ (ประเทศไทย) จำกัด) และ Isothiazolone (ได้รับความอนุเคราะห์จากแผนกบริหารเคมีภัณฑ์ กองเคมีภัณฑ์ การไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย จังหวัดนนทบุรี)

นำสารทดสอบมาเจือจางลงตามลำดับด้วยสารละลายผสมของ Ringer's Solution กับ Tween 80 (อัตราส่วน 9:1) โดยเจือจางลงระดับละ 2 เท่าโดยปริมาตร จากนั้นเตรียมเชื้อทดสอบโดยนำแบคทีเรีย อายุ 1 วัน บน NA Slant เชื้อราอายุ 3 วัน ที่เจริญบน MPA Slant มาเตรียมเป็นเซลล์และสปอร์แขวนลอยตามวิธีในข้อ 2.2 ปิเปิดแบคทีเรียมา 0.1 มิลลิลิตร Spread ลงในจานเพาะเชื้อ NA ส่วนสปอร์เชื้อรา Spread ลงบนจานอาหาร MPA แล้วนำกระดาษซับกลมเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร วางบนจานอาหารที่ Spread Plate ไว้ ปิเปิดสารทดสอบแต่ละความเจือจาง 20 ไมโครลิตร หยดลงบนกระดาษซับ และหยดสารละลายที่ใช้เจือจางเป็นตัวอย่างควบคุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 2-3 วัน สังเกตวงใสที่เกิดขึ้น และจดบันทึกเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสและหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (Minimum Inhibitory Concentration; MIC)

2.5 การทำให้เกิดไบโอฟิล์มในไส้กรองน้ำมันดีเซล

นำไส้กรองน้ำมันดีเซล (CORNER รุ่น 9-88511-

191-1 สำหรับอีซูซุ JMC) มาตัดส่วนกระดาษที่พับอยู่ภายในให้เป็นชิ้นขนาด 2×2 ตารางเซนติเมตร วนมาเชื้อที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง เทหัวเชื้อราแขวนลอยที่มีจำนวนสปอร์เริ่มต้นประมาณ 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ผ่านชิ้นไส้กรองที่วางอยู่บนแท่นกรองของชุดกรองแบบคทีเรียทิ้งไว้ 15 นาทีจึงเปิดเครื่องปั๊มกรอง จากนั้นนำชิ้นกระดาษไส้กรองน้ำมันที่มีสปอร์เชื้อราใส่ในขวดฝาเกลียวเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาด 4 ออนซ์ ที่บรรจุสารผสมของน้ำมันไบโอดีเซลที่ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรอง (30 มล.) และอาหาร BHB (15 มล.) ขวดละ 3 ชิ้น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน หลังจากนั้นนำกระดาษไส้กรองล้างโดยจุ่มลงในสารละลาย Ringer's Solution 2 ครั้ง เพื่อให้เชื้อที่ไม่สามารถเกาะกับกระดาษไส้กรองหลุดออกไปเหลือเพียงโครงสร้างที่เกาะแน่นอยู่ซึ่งเป็นไบโอฟิล์ม

2.6 การทดสอบประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อต่อการควบคุมการเจริญของไบโอฟิล์ม

เลือกระดับความเจือจางน้อยที่สุดของสารฆ่าเชื้อจากที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ (MIC) จากข้อ 2.4 มาทดสอบศักยภาพในการควบคุมไบโอฟิล์ม โดยนำชิ้นกระดาษไส้กรองที่เกิดไบโอฟิล์มข้างต้นแช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นเก็บชิ้นกระดาษไส้กรองล้างในสารละลาย Ringer's Solution 2 ครั้ง วางทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง นำมาตรวจหาเปอร์เซ็นต์การเกิดไบโอฟิล์มบนพื้นผิวโดยนำชิ้นกระดาษมาย้อมด้วย Acridine Orange (0.001% w/v) เป็นเวลา 3 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 2 รอบ นำไปส่องกล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนส์ผ่านชุดเลนส์กรองแสงสำหรับช่วงคลื่น BP 420 - 490 นาโนเมตร บันทึกภาพผ่านกล้องดิจิตอลเป็นไฟล์ภาพ (.jpg) ที่กำลังขยาย 400 เท่า ตัวอย่างละ 10 ตำแหน่ง นำไฟล์ภาพทั้งหมดมาประมวลหาเปอร์เซ็นต์การเกิดไบโอฟิล์มบนพื้นผิวด้วย “โปรแกรมชววิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ของจุลินทรีย์บนพื้นผิว” [12] และตรวจสอบการรอดชีวิตของเชื้อทดสอบโดยการนำชิ้นกระดาษไส้กรองวางบนจาน

อาหารเลี้ยงเชื้อ MPA บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 3 - 5 วัน สังเกตการเจริญเทียบกับขึ้นกระดาะไส้กรองไบโอฟิล์มที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ (ตัวอย่างควบคุม)

3. ผลการทดลอง

3.1 จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในน้ำมันไบโอดีเซล

ผลการแยกจุลินทรีย์ในน้ำมันไบโอดีเซลจากสถานบริการน้ำมันต่าง ๆ 11 แห่ง พบว่าจานอาหารแต่ละจานมีจุลินทรีย์เจริญอยู่ระหว่าง 1 - 5 โคลนนี้ แบ่งเป็นแบคทีเรีย 30 ไอโซเลต ในจำนวนนี้พบสร้างเอนโดสปอร์ได้ 9 ไอโซเลต และแยกราได้ 39 ไอโซเลต สถานบริการที่พบแบคทีเรียมากที่สุด คือสถานบางจากสาขาบางกรวย ได้แบคทีเรีย 5 ไอโซเลต สถานีที่พบเชื้อรามากที่สุด คือสถานบางจากสาขาหมู่บ้านเศรษฐกิจและสถานี ปตท. สาขาบางลำภู พบรา 6 ไอโซเลตและสถานีบริการที่พบจุลินทรีย์มากที่สุดคือสถานีปตท. สาขาบางลำภูพบจุลินทรีย์ทั้งหมด 9 ไอโซเลต (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 จำนวนจุลินทรีย์ที่แยกได้จากน้ำมันไบโอดีเซล (ปี5) จากสถานบริการต่างๆ

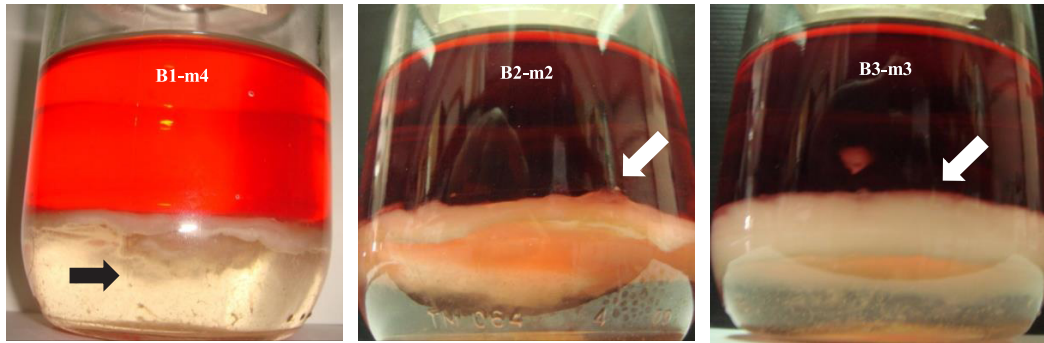
สถานีน้ำมัน/ สาขา	รหัส ไอโซเลต	จำนวน แบคทีเรีย	จำนวนรา
บางจาก/ อ้อมน้อย	B1	3	4
บางจาก/ บางกรวย	B2	5	2
บางจาก/ หมู่บ้าน เศรษฐกิจ	B3	0	6
เชลล์/ บางพลัด	S1	4	4
เชลล์/ บางแค	S2	4	2
เชลล์/ บางโพ	S3	3	2
ปตท./บางพลัด	P1	0	5
ปตท./ บางลำภู	P2	3	6
ปตท./ สนามบิน ดอนเมือง	P3	3	4
ปิโตรนาส/ อ้อมใหญ่	N1	2	1
เอสโซ่/ บางแค	E1	3	3
รวม		30	39

ผลการย้อมสีราด้วย Lactophenol Cotton Blue และศึกษารูปร่างได้กล้องจุลทรรศน์พบเฉพาะการสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศซึ่งเมื่อจำแนกจากลักษณะทางสัณฐานเบื้องต้นพบว่าตรงกับสกุล *Aspergillus* (70%) *Penicilium* (20%) *Byssosclamyces* (8%) และ *Mucor* (2%) ส่วนลักษณะโคโลนี สีของสปอร์และเส้นใยมีความแตกต่างกันไป

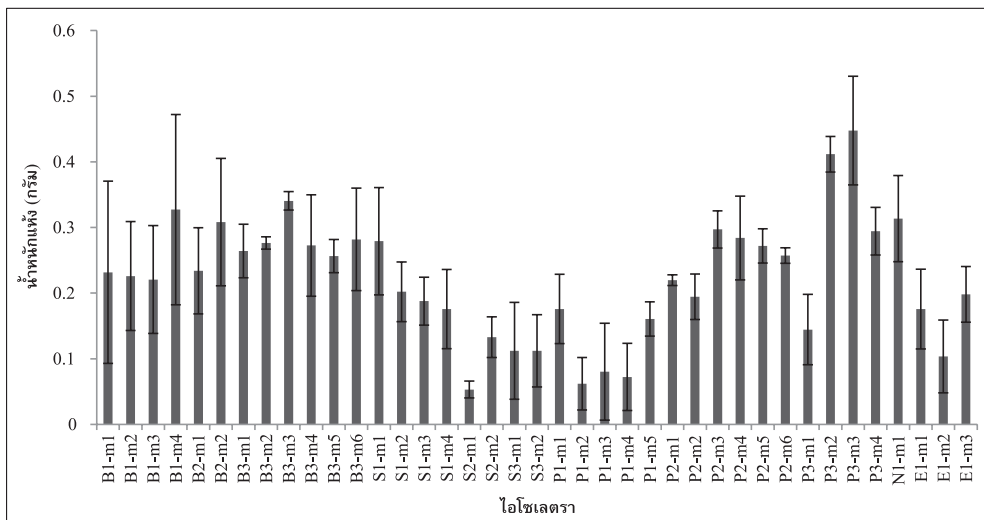
3.2 การเจริญของจุลินทรีย์ที่แยกได้ ในน้ำมันไบโอดีเซล

ขวดอาหารสำหรับทดสอบการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์นี้ประกอบด้วยน้ำมันไบโอดีเซลที่ผ่านการกรองเพื่อกำจัดเชื้อแล้วผสมกับอาหาร BHB ในอัตราส่วน 2:1 ทำให้อาหารมีลักษณะแยกเป็น 2 ชั้นคือน้ำมันไบโอดีเซลซึ่งมีสีออกแดงจะลอยอยู่ด้านบนเหนืออาหารเหลวที่อยู่ด้านล่าง เมื่อนำแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำมันทุกไอโซเลตเลี้ยงในขวดอาหารทดสอบนี้พบว่าแบคทีเรียเจริญได้น้อยหรือไม่เจริญเลยเนื่องจากอาหารขุ่นน้อยและการเก็บตัวอย่างเพื่อมานับจำนวนบนอาหาร NA ไม่พบโคโลนีเจริญหรือพบน้อยมาก อาหาร BHB เป็นอาหารที่ไม่มีแหล่งคาร์บอน มีโพแทสเซียมไนเตรทเป็นส่วนประกอบเพียง 0.1% และมีแร่ธาตุเป็นส่วนประกอบในปริมาณเล็กน้อย ดังนั้นจุลินทรีย์จึงต้องอาศัยแหล่งคาร์บอนจากน้ำมันในการเจริญ แสดงว่าแบคทีเรียที่แยกอาจเป็นแบคทีเรียที่ปนเปื้อนมาจากอากาศ หรือฝุ่นดินที่ไม่มีความสามารถย่อยน้ำมันไบโอดีเซลได้

ในขณะที่เชื้อราที่แยกได้เมื่อเลี้ยงในอาหาร BHB ผสมน้ำมันไบโอดีเซลมีการเจริญของเส้นใยอยู่ระหว่างชั้นอาหารและน้ำมันเกือบทุกไอโซเลต บางไอโซเลตเส้นใยเจริญขึ้นไปในชั้นน้ำมันอย่างชัดเจน บางไอโซเลตเส้นใยเจริญอยู่ในชั้นอาหารเหลวมากกว่า (รูปที่ 1) เมื่อเลี้ยงนาน 28 วันพบว่าไอโซเลตที่มีน้ำหนักรงเส้นใยมากที่สุดได้แก่ P3-m3 โดยมีน้ำหนักเซลล์ 447.7 มิลลิกรัม รองลงมาได้แก่ P3-m2 และ B3-m3 ได้น้ำหนัก 411.6 และ 340.5 มิลลิกรัมตามลำดับ (รูปที่ 2)



รูปที่ 1 การเจริญของเส้นใยเชื้อราระหว่างชั้นน้ำมันไบโอดีเซลและอาหาร BHB ไอโซเลต B1-m4 เส้นใยเจริญลงไป
ในอาหารเหลว (ครีชีสีดำ) ไอโซเลต B2-m2 และ B3-m3 เส้นใยเจริญขึ้นมาบนชั้นน้ำมัน (ครีชีสีขาว)



รูปที่ 2 น้ำหนักเซลล์แห้งของราที่เลี้ยงในไบโอดีเซลผสมอาหาร BHB (2:1) นาน 28 วัน Error Bar แสดงส่วนเบี่ยง
เบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ

3.3 ทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ที่พบในน้ำมันไบโอดีเซล

เนื่องจากปัจจุบันมีสารเพิ่มประสิทธิภาพเครื่องยนต์หรือสารเติมแต่งจำหน่ายในเชิงพาณิชย์โดยให้เติมลงไปพร้อมกับการเติมน้ำมันรถ เพื่อทดสอบว่าสารเหล่านี้ นอกจากมีคุณสมบัติในการเพิ่มประสิทธิภาพหรือทำความสะอาดระบบเครื่องยนต์แล้วยังมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในน้ำมันได้หรือไม่ จึงได้ทำการทดสอบสารเหล่านี้กับจุลินทรีย์ที่แยกได้ทุกไอโซเลต

การทดสอบกับแบคทีเรียได้ผลดังตารางที่ 2 ไม่มีสารใดที่มีฤทธิ์ยับยั้งได้ทุกไอโซเลต มีเพียงสาร STP Fuel System Cleaner ที่ยับยั้งได้มากที่สุด 10 ไอโซเลตจากทั้งหมด 21 และส่วนใหญ่ต้องใช้ในระดับที่ยังไม่เจือจางจึงจะเห็นบริเวณใสได้ชัดเจน

กรณีของรา 39 ไอโซเลต พบว่าสารเติมแต่งที่ทดสอบเกือบทั้งหมดไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งรา มีเพียงสาร STP Fuel System Cleaner ที่สามารถยับยั้งเชื้อราได้เพียง 2 ไอโซเลตคือ B3-m3 และ P3-m2 ในระดับที่ไม่เจือจางสารเลย (MIC = 1)

ตารางที่ 2 ค่า MIC ของสารเพิ่มประสิทธิภาพเครื่องยนต์ ต่อการยับยั้งแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำมัน ไบโอดีเซล

ไอโซเลต แบคทีเรีย	ค่า MIC ของสารเติมแต่ง					
	A	B	C	D	E	F
B1-b1	-	0.25	-	0.50	-	-
B1-b2	-	1.00	-	1.00	-	-
B1-b3	-	-	-	-	-	-
B2-b1	-	1.00	-	-	-	-
B2-b2	-	-	0.25	-	-	-
B2-b3	-	-	-	-	0.25	-
B2-b4	-	-	-	-	-	-
B2-b5	-	0.25	-	0.25	-	-
S1-b1	-	-	-	-	-	-
S1-b2	-	-	-	-	-	-
S1-b3	-	-	-	-	-	-
S1-b4	-	0.50	-	1.00	-	-
S2-b1	0.25	-	-	0.25	-	-
S2-b2	0.50	0.50	-	1.00	-	-
S2-b3	-	-	-	-	-	-
S2-b4	-	-	-	-	-	-
S3-b1	-	-	-	-	-	-
S3-b2	-	-	-	-	-	-
S3-b3	-	-	-	-	-	-
P2-b1	-	-	-	0.50	-	-
P2-b2	-	1.00	-	1.00	-	-
P2-b3	-	-	-	1.00	1.00	-
P3-b1	-	-	-	-	-	-
P3-b2	-	1.00	-	0.50	-	-
P3-b3	-	-	-	-	-	-
N1-b1	-	-	-	-	-	-
N1-b2	-	-	-	-	-	-
E1-b1	-	-	-	-	-	-
E1-b2	-	-	-	-	-	-
E1-b3	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ A คือ STP Octane Booster, B คือ STP Fuel Injector and Carburetor Treatment, C คือ STP Fuel Injector Cleaner, D คือ STP Fuel System Cleaner, E คือ Motor Plus X-1R Diesel System Treatment I, F คือ Top 1 Power Booster - ไม่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

ส่วนการทดสอบสารฆ่าเชื้อ 2 ชนิด ได้แก่ Grotamar 71 และ Isothiazolone พบว่าสาร Grotamar 71 มีค่า MIC ที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 1/16 (0.0625) - 1/32 (0.3125) ส่วนสาร Isothiazolone มีค่า MIC ในระจความเจือจางที่ต่ำมากคือ > 1/1024 กับแบคทีเรียทุกไอโซเลตอย่างไรก็ตามจากผลทดสอบความสามารถในการเจริญของแบคทีเรียที่แยกได้ในน้ำมันไบโอดีเซลข้างต้นพบว่าแบคทีเรียทุกไอโซเลตไม่เจริญหรือเจริญน้อยในน้ำมันไบโอดีเซล ดังนั้นแบคทีเรียที่แยกได้จึงไม่น่าจะส่งผลกระทบต่อคุณภาพของน้ำมันทั้งในถังเก็บและในการใช้กับเครื่องยนต์ได้

ในขณะที่เชื่อว่ามีกรเจริญดีกว่าจึงได้คัดเลือกเชื้อราที่เจริญได้ดีในน้ำมันมา 6 ไอโซเลต มาทำการทดสอบกับสารฆ่าเชื้อ (ตารางที่ 3) พบว่าค่า MIC ของสาร Grotamar 71 อยู่ในช่วง 1/8 (0.125) - 1/16 (0.0625) ส่วน Isothiazolone มีค่า MIC ในระดับความเจือจางที่ต่ำมากคือ > 1/1024 เช่นเดียวกันนอกจากนี้เชื้อราทั้ง 6 ได้ถูกส่งไปจำแนกชนิดโดยวิธีอณูชีววิทยาจากการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบส 18S rRNA ที่สำนักพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ จำแนกไว้ในตารางที่ 3 โดยพบว่าราที่เจริญได้ดีในน้ำมันเป็นราในสกุล *Aspergillus* ถึง 5 ไอโซเลตและมีเพียงไอโซเลตเดียวที่เป็น *Talaromyces spectabilis* (B3-m3) ซึ่งเป็นชื่อชนิดที่เรียกในระยะสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ส่วนระยะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศจะอยู่ในสกุล *Penicillium*

ตารางที่ 3 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารฆ่าเชื้อในการ ยับยั้งเชื้อรา (MIC) ที่เจริญได้สูงสูดในน้ำมัน ไบโอดีเซล 6 ไอโซเลต

ไอโซเลตรา	ชนิดที่ จำแนกได้	ค่า MIC สำหรับ	
		Grotamar71	Isotiazolone
B1-m4	<i>Aspergillus terreus</i>	0.0625	0.001
B2-m2	<i>Aspergillus flavus</i>	0.125	0.001
B3-m3	<i>Talaromyces spectabilis</i>	0.125	0.0005
P3-m2	<i>Aspergillus flavus</i>	0.0625	0.0005
P3-m3	<i>Aspergillus</i> sp.*	0.125	0.001
N1-m1	<i>Aspergillus</i> sp.*	0.0625	0.0005

* ลำดับเบสไม่สามารถระบุชนิดที่ตรงกับฐานข้อมูลได้เกิน 90%

3.4 การเกิดไบโอฟิล์มและการยับยั้งไบโอฟิล์มด้วยสารฆ่าเชื้อ

ไอโซเลตของเชื้อราเจริญได้ดีที่สุดในน้ำมันไบโอดีเซลผสมอาหาร BHB จากการทดลอง 3.3 (P3-m3) ถูกคัดเลือกมาทำให้เกิดไบโอฟิล์มในกระดาศไส้กรองน้ำมันและศึกษาประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อตามค่า MIC ต่อการควบคุมการเจริญของไบโอฟิล์ม

พบว่าเชื้อราสร้างเส้นใยยึดเกาะกับกระดาศไส้กรองน้ำมันและแผ่กระจายเป็นร่างแห การทดสอบด้วยสารฆ่าเชื้อ Grotamar 71 และ Isothiazolone เป็นเวลา 30 นาทีที่ระดับความเจือจางเดียวกับช่วง MIC ผลจากการวิเคราะห์ภาพที่บันทึกจากกล้องจุลทรรศน์เมื่อย้อมด้วยสารเรืองแสง ด้วยซอฟต์แวร์ “โปรแกรมช่วยวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ของจุลินทรีย์บนพื้นผิว” [12] โดยซอฟต์แวร์นี้ทำการวิเคราะห์ภาพดิจิทัลที่บันทึกจากกล้องจุลทรรศน์โดยอาศัยความแตกต่างระหว่างจำนวนพิกเซลทั้งหมดที่ปรากฏสี (จากการย้อมสารเรืองแสงบนเซลล์จุลินทรีย์) เทียบกับจำนวนพิกเซลทั้งหมดของภาพแล้วแปลงเป็นเปอร์เซ็นต์ พบว่าการเกิดไบโอฟิล์มลดลงเกือบหมด (ตารางที่ 4) เทียบกับตอนเริ่มต้นที่แผ่นไส้กรองมีไบโอฟิล์มอยู่ 8.5% นอกจากนี้เมื่อนำกระดาศไส้กรองน้ำมันที่ผ่านการแช่สารฆ่าเชื้อแล้วไปวางบนอาหาร MPA และบ่มเป็นเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิห้องเพื่อทดสอบการรอดชีวิตของเซลล์ ไม่พบราเจริญกลับมานบนอาหาร

ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์ไบโอฟิล์มของ *Aspergillus* sp. (P3-m3) บนกระดาศไส้กรองน้ำมันหลังแช่สารฆ่าเชื้อนาน 30 นาที

สารฆ่าเชื้อ	ความเข้มข้นสาร	เปอร์เซ็นต์ไบโอฟิล์มบนไส้กรอง (เฉลี่ย 10 พิลด์)
Grotamar 71	0.25	0.03
	0.125	0.32
Isotiazolone	0.002	0.04
	0.001	0.13
ตัวอย่างควบคุม (ไบโอฟิล์ม 3 วัน)	ก่อนแช่สาร	8.50

4. อภิปรายผลและสรุป

การแยกจุลินทรีย์จากน้ำมันไบโอดีเซล (B5) จำนวน 11 สถานีบริการได้แบคทีเรีย 30 ไอโซเลต และราที่สร้างเส้นใยได้ 39 ไอโซเลต ไม่พบยีสต์ เมื่อจำแนกเบื้องต้นตามวิธี [11] จากลักษณะการสร้างสปอร์แบบไม้อาศัยเพศพบว่าราส่วนใหญ่ (รวมแล้วมากกว่า 80%) อยู่ในสกุล *Aspergillus* และ *Penicillium*

Rodriguez และคณะ [13] ได้แยกจุลินทรีย์จากถังเก็บน้ำมันโดยเก็บจากส่วนบนของถังเก็บและส่วนล่างของถังพบจุลินทรีย์สูงสุดบริเวณด้านล่างของถังเก็บน้ำมันพบเชื้อราทั้งหมด 75 ไอโซเลตเป็นยีสต์ *Penicillium* มากที่สุด Gaylarde และคณะ [9] ได้รวบรวมกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถแยกได้จากเชื้อเพลิงสำหรับยานพาหนะไว้ว่ามีแบคทีเรีย 18 สกุล ส่วนที่สร้างเอนโดสปอร์ได้มักอยู่ในสกุล *Bacillus* spp. ยีสต์เคยมีรายงานการแยกได้ 5 สกุล และราพบ 34 สกุล ราส่วนใหญ่อยู่ในสกุล *Aspergillus* และ *Penicillium* ซึ่งสอดคล้องการงานวิจัยนี้ เชื้อราที่พบนี้เป็นสกุลที่สามารถพบทั่วไปในดินซึ่งมีทั้งการสร้างสปอร์สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ เช่น *Mucor*, *Penicillium*, *Aspergillus* เป็นต้น [14] จุลินทรีย์ปนเปื้อนเข้าสู่น้ำมันเชื้อเพลิงได้ทั้งทางดิน อากาศ น้ำล้างท่อส่งที่มีการปนเปื้อน หรือจากไบโอฟิล์มที่เกาะติดอยู่บนพื้นผิวของถังเก็บน้ำมัน สารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่จุลินทรีย์นำไปใช้ในการเจริญได้ดีมักมีอะตอมคาร์บอน 10 - 18 (C10 - C18) [9] ไบโอดีเซลมีคาร์บอนอยู่ระหว่าง 16 - 18 อะตอม [3]

การทดสอบการเจริญของจุลินทรีย์ในน้ำมันผสมอาหารเหลว BHB (2:1) พบว่าแบคทีเรียเจริญในน้ำมันและอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ได้ค่อนข้างน้อยและเกือบทั้งหมดไม่พบโคไลนีเจริญเมื่อนำมาตรวจนับจำนวนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ต่างจากเชื้อราที่มีการเจริญอยู่ในระหว่างชั้นน้ำมันและชั้นอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์อย่างชัดเจนนอกจากนี้ยังพบว่ามีราบางไอโซเลต มีเส้นใยที่สามารถเจริญขึ้นไปยังชั้นน้ำมันได้ชัดเจน (รูปที่ 1) แม้มีรายงานว่าสามารถแยกจุลินทรีย์จากน้ำมันเชื้อเพลิงได้หลายชนิด แต่มี

เพียงบางชนิดเท่านั้นที่ย่อยน้ำมันเพื่อไปใช้ในการเติบโตของเซลล์ได้หลายชนิดเป็นเพียงจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมาจากสภาพแวดล้อมและรอดชีวิตอยู่ [9]

ผลการยืนยันชนิดของเชื้อราที่เจริญสูงสุดในน้ำมันไบโอดีเซลทั้ง 6 ไอโซเลตด้วยวิธีอณูชีววิทยาโดยการหาลำดับเบสบน 18s rDNA พบว่าเป็น *Aspergillus* spp. 5 ไอโซเลต และ *Talaromyces spectabilis* ซึ่งเป็นชื่อที่ใช้เรียกเชื้อราที่พบระยะสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศชนิดหนึ่งของ *Penicillium* sp.

การทดสอบสารเพิ่มประสิทธิภาพเครื่องยนต์หรือสารเติมแต่ง 6 ชนิดที่จำหน่ายในท้องตลาดพบว่าไม่มีผลต่อจุลินทรีย์ ดังนั้นหากน้ำมันเชื้อเพลิงมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในปริมาณสูง การเติมสารเหล่านี้จึงไม่ส่งผลในการทำลายจุลินทรีย์แต่อย่างใด

การทดสอบการยับยั้งการเจริญของราจำนวน 6 ไอโซเลตที่มีการเจริญสูงที่สุดกับสารฆ่าเชื้อจำนวน 2 ชนิด สารฆ่าเชื้อ Grotamar 71 และ Isothiazolone ผลการทดลองพบว่า Isothiazolone มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของราได้ดีกว่าเนื่องจากใช้ความเจือจางปริมาณน้อยก็สามารถยับยั้งการเจริญของราได้ สาร Grotamar 71 เป็นสารเติมแต่งที่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อสำหรับเติมในน้ำมันดีเซล เป็นผลิตภัณฑ์จากประเทศเยอรมัน มีลักษณะเป็นของเหลวใสสีเหลืองใช้เติมลงไปในรถยนต์พร้อมๆ กับการเติมน้ำมันเชื้อเพลิง สารออกฤทธิ์คือ 3,3'-Methylenebis (5-Methyloxazolidinyl) สัดส่วนที่ผู้ผลิตแนะนำให้ใช้คือ 25 มิลลิลิตรต่อน้ำมันเชื้อเพลิง 100 ลิตร เอกสารการทดสอบประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อของผู้ผลิตแสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์ทดสอบที่ทดสอบนี้ได้สูงสุดมีค่า MIC 0.150 คือ *H. resinae* ส่วนราอื่นได้แก่ *A. niger* และ *P. funiculosum* มีค่า MIC 0.030 และ 0.150 ตามลำดับ [15] ในขณะที่ค่า MIC ของ *Aspergillus* spp. ที่แยกได้จากงานวิจัยนี้เป็น 0.125 ส่วน Isothiazolone หรือสาร 5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one เป็นสารฆ่าเชื้อที่ใช้มากในการป้องกันการเกิดไบโอฟิล์มในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น ระบบหล่อเย็นในโรงผลิตไฟฟ้า นอกจากนี้ยังละลาย

ได้ในน้ำมัน [9] Guimet and Gaylarde [16] ได้ทดลองใช้สาร Isothiazolone ในการยับยั้งไบโอฟิล์มของรา *H. resinae* บนพื้นผิวสแตนเลสสตีล พบว่ามีประสิทธิภาพเมื่อใช้ความเจือจาง 50 และ 100 ppm

จุลินทรีย์ตามธรรมชาติมักเกาะติดบนพื้นผิวหรือเรียกอีกอย่างว่าไบโอฟิล์มมากกว่ากระจายอยู่ในรูปเซลล์แขวนลอย เพื่อดักจับอาหารและอยู่รอดได้ดีขึ้นในสภาวะที่มีสารอาหารต่ำ [10] เมื่อจุลินทรีย์เกิดไบโอฟิล์มมีรายงานว่าสามารถทนต่อสารฆ่าเชื้อโรคได้มากกว่าเซลล์แขวนลอย 10 - 100 เท่า [17] การใช้คลอรีน (200 ppm) และ peroxyacetic acid (0.4%) เป็นเวลา 8 นาที สามารถลดเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Pseudomonas fluorescens* ได้ถึง 8 log แต่กลับทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อดังกล่าวได้เพียง 3 - 4 log [18] ด้วยเหตุนี้งานวิจัยนี้จึงได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อกับไบโอฟิล์มของรา P3-m3 (*Aspergillus* sp.) ซึ่งเป็นไอโซเลตที่พบว่าเจริญได้ดีที่สุดในน้ำมันไบโอดีเซล หลังจากบ่ม 3 วัน ที่อุณหภูมิห้องเชื้อราสร้างไบโอฟิล์มโดยเส้นใยเกาะพันเป็นร่างแหกับกระดาษไส้กรองเชื้อเพลิงและเมื่อทำการยับยั้งไบโอฟิล์มด้วยการแช่ในสารฆ่าเชื้อ Grotamar 71 หรือ Isothiazolone ที่ระดับความเจือจางที่เป็นค่า MIC ที่ทดสอบเบื้องต้นบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (1/8 และ 1/1024 ตามลำดับนาน 30 นาที) พบว่าสามารถควบคุมกำจัดไบโอฟิล์มที่เกิดขึ้นได้ กรณีนี้ไบโอฟิล์มของเชื้อราไม่ต้องการความเข้มข้นของสารที่สูงขึ้นในการทำลาย อาจเป็นเพราะเส้นใยกระดาษของไส้กรองดูดซับสารฆ่าเชื้อไว้ภายในและคงเหลืออยู่แม้ได้ล้างแผ่นไส้กรองแล้ว จึงส่งผลให้คงประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อไว้ได้

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนวิจัยเงินรายได้ คณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์ ประจำปี 2554 ผู้วิจัยขอขอบคุณบริษัทเอ็มเอเอ็นยานยนต์จำกัด และแผนกบริหารเคมีภัณฑ์ การไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทยที่เอื้อเฟื้อสารฆ่าเชื้อที่ใช้ทดสอบ

เอกสารอ้างอิง

- [1] Ministry of Energy, (2014, Mar. 15). *Usage quantity of biodiesel B5 in the year 2007 - 2011*. [Online]. Available: <http://www.energy.go.th/index.php?q=node/69> (in Thai).
- [2] Annual Report 2011 of Ministry of Energy, (2014, Mar. 15). [Online]. Available: http://www.energy.go.th/sites/all/files/annual_report_2011.pdf (in Thai).
- [3] Ministry of Energy, (2014, Apr. 30). *Bio-Diesel*. [Online]. Available: <http://www.energy.go.th/index.php?q=node/385> (in Thai).
- [4] A. Petiruksakul, "Biodiesel Production from Waste Cooking Oil," Research Report, King Mongkut's University of Technology North Bangkok, 2005 (in Thai).
- [5] Wikipedia. (2010, June 28). "Biodiesel" [Online]. Available: <http://en.wikipedia.org/wiki/Biodiesel>
- [6] F.M. Bento, and C.C. Gaylarde, "Biodegradation of stored diesel oil: studies in Brazil," *International Biodeterioration & Biodegradation*, vol. 47, pp. 107-112, 2001.
- [7] B. Klofutar and J. Golob, "Microorganisms in diesel and in biodiesel fuels," *Acta Chim. Slov.*, vol. 54, pp. 744-748, 2007.
- [8] M.R. Monteiro, A.R.P. Ambrozini, L.M. Liao, and A.G. Ferreira, "Critical review on analytical methods for biodiesel characterization," *Talanta*, vol. 77, pp. 593-605, 2008.
- [9] C.C. Gaylarde, F.M. Bento, and J. Kelly, "Microbial contamination of stored hydrocarbon fuels and its control," *Revista de Microbiologia*, vol. 30, pp. 1-10, 1999.
- [10] J.W. Costerton, P.S. Stewart, and E.P. Greenberg, "Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections," *Science*, vol. 284, pp. 1318-1322, 1999.
- [11] Keys to some common genera of moulds, (2010, May 11). [Online]. Available: <http://website.nbm-mnb.ca/mycologywebpages/Moulds/Moulds.html>
- [12] T. Chaihong and K. Thungopakun, "Computer Aid Program for Analysis of Microbial Percentage on Surface," Dissertation, Department of Computer and Information Science, King Mongkut's University of Technology North Bangkok, 2005 (in Thai).
- [13] C.E. Rodríguez-Rodríguez, E. Rodríguez, R. Blanco, I. Cordero, and D. Segura, "Fungal contamination of stored automobile-fuels in a tropical environment," *Journal of Environmental Sciences*, vol. 22, pp. 1595-1601, 2010.
- [14] E.A. Paul and F. E. Clark, *Soil Microbiology and Biochemistry*, 2nd ed., San Diego: Academic Press, 1996.
- [15] Schülke and Mayr GmbH, (2011, Apr. 18). *Grotamar 71*. [Online]. Available: http://www.schuelke.com/download/pdf/cint_lgb_grotamar_71LL.pdf
- [16] P.S. Guimet and C.C. Gaylarde, "Activity of an isothiazolone biocide against *Hormoconis resinae* in pure and mixed biofilms," *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 12, pp. 395-397, 1996.
- [17] J.T. Holah, "Industrial monitoring hygiene in food processing," in *Biofilms - Science and Technology*. L.F. Melo, T.R. Bott, M. Fletcher and B. Capdeville, Eds. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, 1992, pp. 645-659.
- [18] S. Vatanyoopaisarn, "Disinfectant testing for biofilm elimination using modified capacity test," *KMITL Science Journal*, vol. 6, issue 2b, pp. 652-657, 2006.